Л.БАЛЬ-ПРИЛИПКО,
докт. техн. наук, декан факультету харчових технологій та управління якістю продукції АПК
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Пріоритети – уподобанням споживачів

Це – головний орієнтир для науковців-технологів, які спрямовують свої дослідження, передусім, зважаючи на домінуючі тенденції у формуванні попиту на харчові продукти.

У літню пору, як показують дані моніторингу, переважають прагнення поєднувати у споживчому кошику звичні вироби і привабливі новинки із значною часткою сезонного фруктово-овочевого асортименту, що рясніє на торговельних полицях.

Звісно, розробники НУБіПУ не залишаються осторонь вимог, зумовлених часом, тому матеріали пропонованого випуску стосуються широкого кола питань як щодо виготовлення, якості та безпечності, так і урізноманітнення та підвищення поживності продуктів, у тому числі і плодово-овочевих товарів. Про що й довідаєтесь, безпосередньо ознайомившись з нашими публікаціями.

Введение

Одним из возможных путей снижения белкового дефицита является разработка и имплементация в производство технологий белковых гидролизатов. Эти продукты находят широкое применение не только как компонент пищи и среда для микробиологических производств, но и как диетический продукт для спортивного и лечебного питания. Отмечен положительный эффект применения белковых гидролизатов для восстановления белкового баланса в организме, снижения эффекта различных интоксикаций и повышения активности иммунной системы [1].

В производстве белковых гидролизатов, в качестве недорогого источника сырья могут быть использованы различные пищевые отходы, мелкие малотоварные виды рыбы, побочные продукты переработки птицы и животных, а также растительные шроты и жмыхи [2,3].

Наиболее предпочтительным способом производства белковых гидролизатов является ферментативный гидролиз. В этом случае, в отличие от реагентного способа, не происходит разрушения и изомеризации аминокислот. Основной недостаток ферментативных технологий белковых гидролизатов – длительность процесса и связанная с этим опасность развития гнилостной микрофлоры. Частичного предотвращения развития гнилостных процессов можно добиться в результате применения консервантов и сокращения продолжительности гидролиза. Теоретически, для ускорения гидролиза необходимо использовать ферментные препараты, индивидуальные элементы которых наиболее специфичны в отношении белков конкретного вида сырья с температурным оптимумом активности за пределами интервала благоприятного для развития большинства гнилостных микроорганизмов. Однако в реальных субстратных системах эффективность гидролиза белков

УДК 606:664.952/.957

Выбор ферментов для гидролиза промышленных белковых субстратов

А. ВИННОВ, *канд. техн.наук*
Л. БАЛЬ-ПРИЛИПКО, *докт. техн. наук*
Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

Аннотация: *Приведены данные по химическому составу мышечных тканей цыплят-бройлеров, атерины черноморской, шрота сои. Получены экспериментальные кинетические зависимости скорости ферментативного гидролиза от концентрации белка в фермент - субстратных системах для промышленных ферментных препаратов на основе культуральной жидкости Bacillus subtilis. Рассчитаны значения сродства ферментных препаратов Corolase® L7089 и протосубтилин Г3Х как константы Михаэлиса к субстратам на основе птицы, рыбного и растительного сырья.*
Ключевые слова: *сродство, константа Михаэлиса, и Corolase® L7089, белковый гидролизат, протосубтилин Г3Х.*

Abstract: *The chemical composition of broiler chickens muscles, Black sea* Atherina *and soybean meal is presented. The experimental kinetics correlations between enzymatic hydrolysis velocity and protein concentration in the enzyme – substrate systems with industrial enzyme drugs on Bacillus subtilis cultural liquid the base were obtained.The enzyme drugs Corolase ® L708 and Protosubtilin G3X affinity values as the Michaelis constants for substrates based on chicken, fish and plant materials were calculated.*
Keywords: *affinity, Michaelis constant, Corolase ® L7089 protein hydrolyzat, Protosubtilin G3X*

зависит не только от специфичности ферментов и температуры процесса, но и от сложной совокупности свойств и состава ферментного препарата, субстрата и коллоидного состояния всей фермент–субстратной системы. В этом случае мерой эффективности ферментативного катализа может выступать сродство индивидуальных ферментов применяемого ферментного препарата к поликомпонентному субстрату, находящемуся в различном коллоидном состоянии. Количественная оценка сродства фермента к субстрату была рассмотрена в начале 20-го века в фундаментальных трудах по кинетике ферментативных реакций и отражена в уравнении Михаэлиса - Ментен в виде константы Михаэлиса (K_m). Величина этой константы количественно равна концентрации субстрата, при которой достигается скорость процесса, равная половине максимальной. Чем меньше величина K_m,тем выше сродство фермента к субстрату и выше эффективность ферментативного катализа [4]. В своих исследованиях Михаэлис и Ментен рассматривали только модельные фермент-субстратные системы в состоянии раствора. В этой связи, кинетические исследования ферментативного гидролиза промышленных поликомпонентных фермент-субстратных систем для сравнительной оценки величины сродства различных ферментных препаратов к реальным субстратам, представляют бесспорный практический интерес и содержат элементы научной новизны.

Цель настоящей работы состояла в сравнительной оценке величины сродства промышленных протеолитических ферментных препаратов к белкам субстратов на основе тканей птицы, рыбы и растений.

В процессе исследований поставлены следующие задачи:

- определить химический состав принятого в исследованиях сырья;
- на основании полученных экспериментальных данных по химическому составу сырья сформировать необходимые для кинетических исследований фермент - субстратные системы;
- получить экспериментальные зависимости скорости ферментативного гидролиза от концентрации белковых веществ в экспериментальных фермент – субстратных системах и рассчитать значения константы Михаэлиса;

- оценить величину сродства рассмотренных ферментных препаратов к белкам сырья различного происхождения.

Материалы и методы исследования

Для формирования субстратной системы были использованы грудные мышцы цыплят-бройлеров, тушки атерины черноморской (*Atherina mochon pontica*) после удаления головы и внутренних органов, и шрот соевый по ДСТУ 4230:2003.

В исследованиях применяли широко распространенные промышленные протеолитические ферментные препараты Corolase® L7089 (ФРГ) и протосубтилин Г3Х (ГОСТ 23636) производства завода биоферментных препаратов «Энзим» (Украина), полученные из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* при ее глубинном культивировании. Декларированная протеолитическая активность ферментного препарата Corolase® L7089 составляла 850 ПЕ/г, а протосубтилина Г3Х – 70 ПЕ/г .

О химическом составе сырья судили по содержанию влаги, общего и небелкового азота, липидов, экстрагируемых этиловым эфиром, минеральных веществ.

Скорость процесса ферментолиза оценивали по накоплению продуктов гидролиза белка в единицу времени, которую рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{6{,}25 \cdot (НБА - НБА_0)}{\tau}$$, где

НБА - количество небелкового азота после инкубации, мг/100г; $НБА_0$ - количество небелкового азота в сырье, мг/100г; - продолжительность инкубации, мин.

Общий азот, массовую долю влаги, липидов проводили стандартными методами; небелкового азота - по Къельдалю после осаждения высокомолекулярных белков трихлоруксусной кислотой с конечной концентрацией 5%. Для определения различных форм азота в работе использовали автоматический анализатор VELP Scientifica.

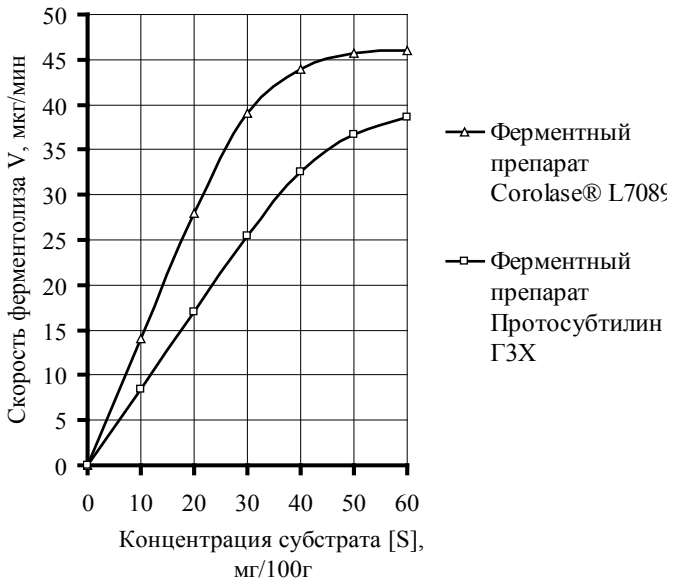

Рис. 1. Зависимость скорости протеолиза от концентрации субстрата на основе тканей птицы

Таблица 1.

Химический состав сырья для формирования фермент-субстратных систем

Объект исследования	Азотистые вещества, мг/100 г			Массовая доля влаги, %	Массовая доля жира, %	Массовая доля неральных веществ, %
	общий азот, (ОА)	небелковый азот, ($НБА_0$)	белковый азот, (ОА-НБА)			
Тушки атерины	2752,00	146,30	2567,50	78,60	2,10	4,60
Грудные мышцы цыплят - бройлеров	3136,00	144,00	2992	76,20	1,80	1,23
Шрот сои	6832	79,00	6753	10,76	1,57	1,51

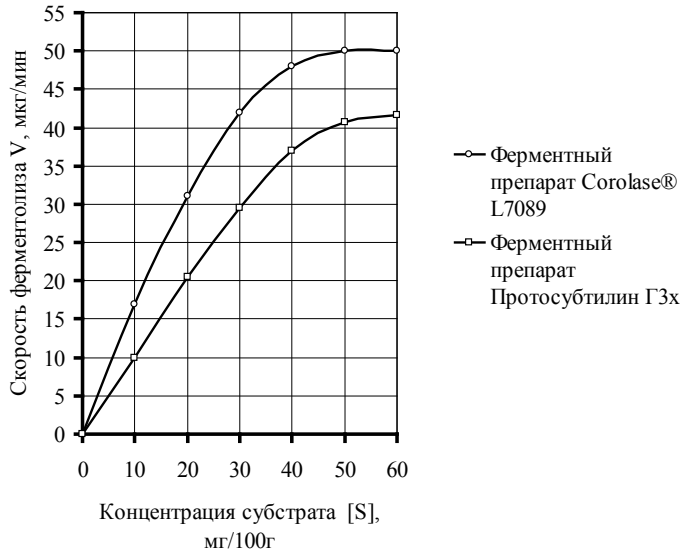

Рис.2. Зависимость скорости протеолиза от концентрации субстрата на основе тканей рыбы

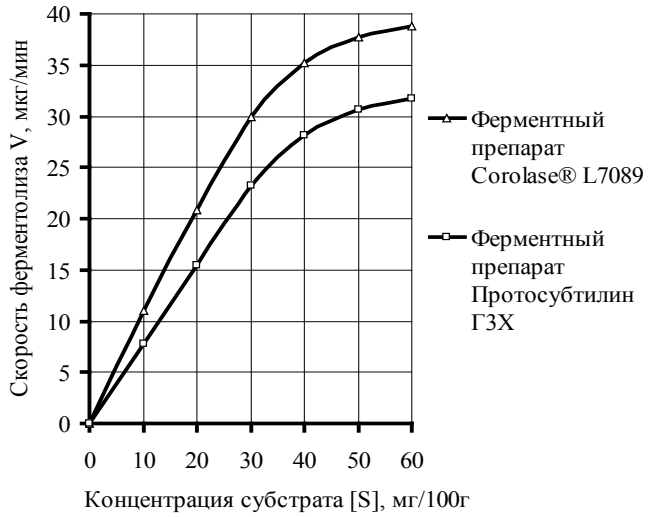

Рис. 3. Зависимость скорости ферментативного гидролиза белков от концентрации субстрата на основе шрота сои

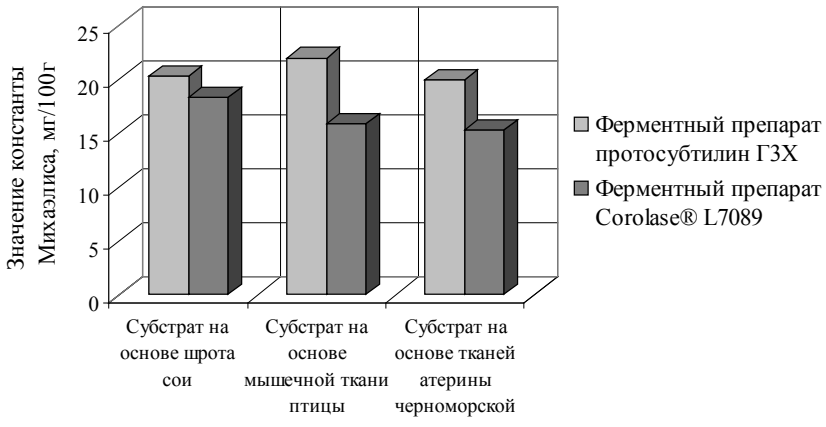

Рис.4. Значение константы Михаэлиса для различных субстратов

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследования химического состава принятого сырья представлены в табл.1.

На основании полученных результатов были сформированы в виде водных диспергатов субстратные системы из измельченных грудной мышечной ткани цыплят-бройлеров, рыбного сырья и шрота сои с диапазоном концентрации белка до 60 мг/100 г с шагом 10 мг/100г. В полученные субстраты вводили принятые в исследованиях ферментные препараты в количестве, обеспечивающем их активность 0,35 ПЕ/г субстратной системы. Гидролиз проводили при температуре 50 С в течении 120 минут при постоянном перемешивании.

Экспериментальные результаты исследования зависимости скорости гидролиза от концентрации субстрата на основе мышечной ткани птицы представлены на рис. 1.

Анализ полученных данных позволяет определить максимальную скорость протеолиза на уровне 45,9 - 46,0 мкг/мин при использовании ферментного препарата Corolase® L7089 и 38,6 мкг/мин в случае применения ферментного препарата протосубтилин Г3х.

Для ферментного препарата Corolase® L7089 уравнение аппроксимирующие зависимость V [S] имеет вид: $V=10^{-5}[S]^4 - 0,0012 [S]^3+0,0318 [S]^2 +1,1922 [S]$, а его решение для значения $V = 0,5 V_{max}$ позволяет получить значение константы Михаэлиса (K_m) равное 15,91 мг/100г.

Решение уравнения аппроксимирующее экспериментальную зависимость V [S] для ферментного препарата протосубтилин Г3Х - $V= 8\cdot10^{-7}[S]^4 - 0,0003 [S]^3+0,0097 [S]^2 + 0,7526 [S]$ для значения $V = 0,5 V_{max}$ определяет значение константы Михаэлиса (K_m) равным 22 мг/100г

Результаты аналогичных исследований проведенных с субстратами на основе тканей рыбы представлены на рис.2.

В этом случае аппроксимирующие зависимости имеют вид: $V=4\cdot10^{-6} [S]^4-0,0005 [S]^3+ 0,0014[S]^2+1,7164[S]$ для ферментного препарата Corolase® L7089 и $V=2\cdot10^{-6}[S]^4-0,0003 [S]^3 +0,0112[S]^2+0,9229[S]$ для ферментного препарата протосубтилин Г3Х. Решение полученных уравнений для значений V= 0,5 Vmax позволили получить значения константы Михаэлиса равные 15,29 и 19,95 мг/100г для Corolase® L7089 и протосубтилина Г3Х соответственно.

Кинетические кривые ферментолиза субстрата на основе шрота сои (рис.3) с высокой точностью апроксимируются уравнениями: $V= 4\cdot10^{-6}[S]^4+0,0006[S]^3+ 0,0134[S]^2+0,9913[S]$ для ферментного препарата Corolase® L7089 и $V= 3\cdot10^{-6}[S]^4 - 0,0005 [S]^3+0,0155[S]^2+0,6488[S]$

для ферментного препарата протосубтилин Г3Х.

В этом случае значение Михаэлиса составляет 18,31 мг/100г для ферментного препарата Corolase® L7089 и 20,26 мг/100г для протосубтилина.

Из сравнения полученных значений константы Михаэлиса (рис. 4) следует, что ферментный препарат Corolase® L7089 имеет более высокое сродство к субстрату во всех рассмотренных системах по сравнению с ферментным препаратом протосубтилин Г3Х.

Максимальное сродство наблюдается при гидролизе рыбного сырья, а минимальное с случае использования шрота сои. Это, вероятно, связано с особенностями коллоидного состояния субстратов. Ферментный препарат протосубтилин Г3Х также проявляет наибольшее сродство к субстрату на основе атерины черноморской, но в отличии от Corolase® L7089 минимальное сродство наблюдается в отношении субстратов на основе тканей птицы. Более высокое сродство этого ферментного препарата к субстратам на основе шрота сои, вероятно, объясняется присущей протосубтилинам невысокой степени очистки (Г3Х) целлюлолитической активности. В этом случае, в результате гидролитического расщепления клетчатки, белки соевого шрота становятся более доступными для катализа гидролиза белков протеазами протосубтилина.

Заключение.

1. Полученные экспериментальные данные по определению величины сродства, дают основания рекомендовать методику экспериментально - теоретического кинетического анализа для выбора наиболее эффективного ферментного препарата при гидролизе промышленных субстратов.

2. Установлено, что высокоочищенные ферментные препараты на основе культуральной жидкости *Bacillus subtilis* проявляют наибольшее сродство к промышленным субстратам на основе тканей рыбы, а наименьшее к субстратам на основе растительного сырья.

3. Выявлено, что протосубтилин Г3Х проявляет высокую степень сродства к субстратам на основе растительного сырья. Это, вероятно, связано с наличием целлюлолитической активности у ферментных препаратов на основе культуральной жидкости *Bacillus subtilis* с малой степенью очистки от сопутствующих «балластных» веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. ***Бердутина А.В.*** *Разработка технологии белковых гидролизатов из вторичного сырья мясной промышленности. / Автореферат на соискание ученой степи кандидат технических наук.// М.: ВНИИМП им. В.М. Горбатова, 2000. 32 с.*
2. ***Румянцева Г.Н.*** *Биокаталитические технологии пищевых белков и полисахаридов . Монография.// М.: МГУПБ, 2007. 233 с.*
3. ***Румянцева Г.Н.*** *Научные и практические аспекты использования ферментативного катализа в пищевой промышленности . Монография.// М.: МГУПБ, 2007. 101 с.*
4. ***Уайт А****. Основы биохимии [Текст]/ Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р. Леман И.//М.: Идательство «Мир», 1981. т.1. 523 с.*

Для збереження якості готової продукції, зниження її собівартості важливе значення в сучасній технології мають харчові добавки, що дають змогу регулювати хімічний склад і функціонально-технологічні властивості готових виробів. Ці причини багато в чому зумовлюють тенденцію до виробництва продуктів, у яких м'ясну основу комбінують з інгредієнтами різного походження. Інтенсифікація технологічних процесів у харчовій технології пов'язана з гострою суспільною потребою в збільшенні обсягу виробництва продуктів споживання шляхом використання нетрадиційної сировини та виготовлення нових видів харчових продуктів.

У зв'язку з недостатньою кількістю, зокрема свинини та яловичини, виробники змушені використовувати сировину з низькими функціональними властивостями (жирна яловичина, легкоплавкий свинячий жир тощо), або створювати композиції, які нівелюють дані відхилення. Це, з одного боку, дає змогу знизити собівартість, а з іншого – може спричинити погіршення смаку і спровокувати виникнення браку у вигляді бульйонно- жирових та желейних набряків тощо.

Основою сучасних видів варених ковбас є процес емульгування. Фарш варених ковбасних виробів являє собою м'ясні емульсії, які складаються із тонкоподрібненого м'яса, води і жиру, причому вода і жир дисперговані і знаходяться в колоїдному стані, а білок і вода створюють просторовий каркас (матрицю), що утримують жир. Можливість одержання і ступінь стабільності емульсії залежить від багатьох факторів, основні з яких: вид, склад і функціонально-технологічні властивості компонентів рецептури; кількість солерозчинних білків; рівень гомогенізації та диспергування; послідовність приготування емульсії; температурно-часові параметри процесу, співвідношення жир-білок-вода, присутність емульгаторів і стабілізаторів[1].